



巩膜胶原交联术防控近视研究的新进展

徐玉珊, 宋彦铮, 张丰菊*

首都医科大学附属北京同仁医院北京同仁眼科中心, 北京市眼科学与视觉科学重点实验室, 北京 100730

* 联系人, E-mail: zhangfj126@126.com

收稿日期: 2022-03-11; 接受日期: 2022-05-06; 网络版发表日期: 2022-06-15

国家自然科学基金(批准号: 81873682, 81570877, 82000933)和北京市经济技术开发区新创工程领军人才培养基金(批准号: 20180509)资助

摘要 近视患病率在全球范围内不断上升, 防控近视极为重要. 近视的发生发展与巩膜重塑、巩膜生物力学性能降低有关. 巩膜胶原交联术是一种可以增强巩膜生物力学性能的方法, 有望成为新型防控近视的有效手段. 巩膜胶原交联术包括光辐照交联法(紫外光-核黄素巩膜胶原交联术、蓝光-核黄素巩膜胶原交联术)和生物交联剂交联法(京尼平、糖类、FARs和Tgases等)两类. 本文就巩膜胶原交联术在防控近视方面的应用方案、有效性及安全性等内容进行综述.

关键词 巩膜, 胶原交联, 近视

近视患病率在全球范围内不断上升, 至2050年全球近视眼患者人数将占全球总人数的49.8%^[1]. 近视已成为我国的重大公共卫生问题, 2018年全国儿童青少年总体近视率为53.6%, 其中6岁儿童为14.5%, 小学生为36.0%, 初中生为71.6%, 高中生为81.0%, 大学生为90%以上^[2]. 近视尤其是高度近视, 不仅是一种屈光不正, 还会增加视网膜脱离、黄斑裂孔、青光眼和白内障等疾病的发生风险, 可能导致不可逆的视力丧失, 因此防治近视极为重要.

已经明确生物分子间发生交联反应可提高其性能, 交联反应的这一特性已成功应用于眼科临床医疗. 将胶原交联术应用于人眼角膜组织, 可通过增加胶原纤维的机械强度阻止角膜进行性扩张性疾病的病理进程, 如原发性和继发性圆锥角膜等的治疗. 而巩膜的主要组成成分与角膜相似, 胶原交联术应用于巩膜组织,

可有效提高巩膜生物力学性能^[3], 增加巩膜组织抵抗胶原酶降解的能力^[4], 这就为巩膜胶原交联术在近视防控方面的应用提供了可能性. 近年来巩膜胶原交联术逐渐成为国内外近视防控学者的关注热点, 相关研究日益增多且进展迅速, 本文将对该领域的研究进展进行阐述.

1 近视发生发展中巩膜的变化

角膜和巩膜共同构成眼球壁的外层, 其中巩膜占5/6, 在维持眼球正常形态方面具有重要作用. 巩膜主要由细胞(以成纤维细胞为主)和细胞外基质(胶原、蛋白多糖和弹性纤维等)组成, 其中胶原成分占巩膜总重的90%, 以I型胶原为主^[5].

近视发生发展时, 视网膜接收异常的视觉刺激, 经

引用格式: 徐玉珊, 宋彦铮, 张丰菊. 巩膜胶原交联术防控近视研究的新进展. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 1076–1088

Xu Y S, Song Y Z, Zhang F J. Advances in preventing myopia by scleral collagen crosslinking (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 1076–1088, doi: 10.1360/SSV-2021-0078

信号通路转导至巩膜, 使巩膜结构和成分发生改变, 巩膜细胞外基质合成减少、降解增加, 巩膜胶原纤维直径减小, 排列分散且不规则, 巩膜变薄, 引起巩膜重塑. 这些结构和成分的改变导致巩膜生物力学性能降低, 在眼内压作用下巩膜扩张、眼轴延长, 最终导致轴性

近视的发生^[6,7]. 因此, 从近视发展的基本病理过程角度, 防控近视的关键在于减少近视巩膜重塑, 增强巩膜的生物力学性能. 根据使胶原产生交联反应所需的介质不同, 巩膜胶原交联术可分为光辐照交联法和生物交联剂交联法(图1).

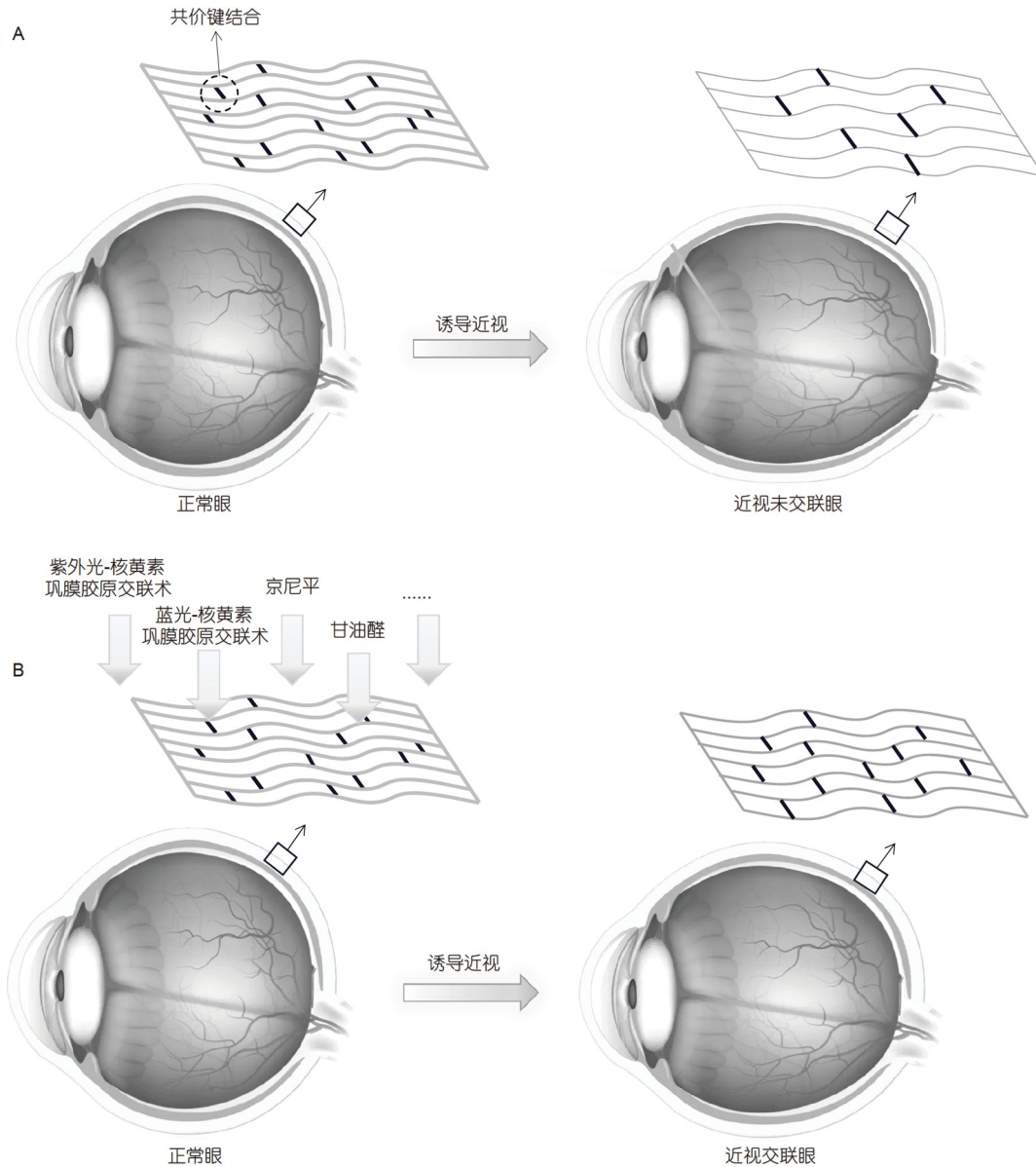


图 1 巩膜胶原交联术方法示意图. A: 诱导近视后, 未交联眼眼轴增长, 巩膜胶原纤维直径变小, 排列分散, 巩膜生物力学性能降低; B: 与未交联眼相比, 交联眼巩膜胶原纤维间共价键结合增多, 巩膜胶原纤维直径增加, 排列紧密, 巩膜生物力学性能增加, 延缓眼轴增长

Figure 1 Schematic of scleral collagen crosslinking. A: The myopic eye without scleral collagen crosslinking shows an axial elongation, a loose arrangement, a reduction in scleral collagen fibers' size, and a decreased biomechanical property of the sclera; B: compared with the myopic eye without scleral collagen crosslinking, the myopic eye with crosslinking shows increased covalent bonds between collagen fibers, a denser arrangement and increased size of scleral collagen fibers, and an improved biomechanical property of the sclera, which prevents myopia development

2 光辐照交联法

目前光辐照交联法主要包括紫外光-核黄素巩膜胶原交联术和蓝光-核黄素巩膜胶原交联术。光辐照交联由光化学反应介导,在该反应中,光敏剂核黄素被激活成三重态,产生以单重态为主的活性氧族,从而诱导胶原纤维内或胶原纤维之间形成新的化学键^[8,9]。利用拉曼光谱技术,在原子力显微镜下可观察到紫外光-核黄素巩膜胶原交联术后交联区巩膜组织间化学键发生改变,且胶原纤维的排列呈现交错式排列,使其比交联前平行排列的胶原纤维束更加致密^[10],胶原纤维的密度、面积、直径和厚度增加^[11],从而增加巩膜生物力学性能。

利用二次谐波(second harmonic generation, SHG)显微镜也观察到光化学交联后胶原纤维排列更加无序但更加紧密,尤其是表层胶原纤维。利用光漂白荧光恢复技术(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)还发现交联区及交联区外250 μm 范围内渗透性降低^[12]。

2.1 光辐照交联法交联方案的建立及改进

自光辐照交联法交联术应用于眼科研究领域以来,国内外学者对紫外光-核黄素巩膜胶原交联术和蓝光-核黄素巩膜胶原交联术的方案进行了大量的探索和改进。

(1) 紫外光-核黄素巩膜胶原交联方案的建立及改进。Wollensak和Spoerl^[13]最早提出紫外光-核黄素巩膜胶原交联能显著增强离体人眼和猪眼的巩膜生物力学性能。随后, Wollensak等人^[14]又以活体兔眼为实验对象,采用370 nm紫外光以4.2 mW/cm^2 的辐照强度照射30 min的交联方案进一步验证了紫外光-核黄素巩膜胶原交联术增强巩膜生物力学性能的有效性,但组织病理学结果显示,照射区域相对应的视网膜伴有明显损伤。2009年,其改进交联方案,采用370 nm紫外光以3.0 mW/cm^2 的辐照强度照射30 min,证明该交联方案同样能显著增强巩膜生物力学性能且不伴有视网膜组织损伤,交联效果可维持长达8个月^[15]。这些研究证实了紫外光-核黄素巩膜胶原交联术的有效性,并建立了经典交联方案,为后续研究奠定了初步基础。

近年来,国内外学者不断从核黄素的浓度及巩膜组织浸泡饱和时间、交联参数的优化和交联装置等多

方面探索。张丰菊教授团队张学敏等人^[16]发现,核黄素浸润20 min可在人尸眼和兔眼巩膜组织内达到饱和状态。同时,本团队Wang等人^[17]率先提出交联后赤道部的巩膜生物力学性能高于后极部,赤道部可能是最佳的交联部位的论点。Gawargious等人^[18]也得出了相似的结论,且外侧巩膜生物力学性能高于内侧。Zhang等人^[19]研究发现,紫外光照射40 min及以上时,兔眼巩膜生物力学性能均显著增加,但照射50和60 min时存在视网膜损伤。Xiao等人^[20]改进了交联设备,仅需通过微小结膜切口(7 mm)插入特制的柔性LED探头,使兔眼照射区域赤道部和后极部巩膜生物力学性能显著增加。王红燕等人^[21]进一步验证了这种微创紫外光-核黄素巩膜胶原交联术对眼球各组织无明显病理性损害。

(2) 蓝光-核黄素巩膜胶原交联方案的建立及改进。紫外光在巩膜的穿透力弱,而蓝光穿透力更强,波长更长,同时更小的光子能量可降低潜在的生物学损伤,理论上与核黄素进行胶原交联反应的效果更佳。Iseli等人^[22]研究表明,蓝光(465 nm)-核黄素(浓度0.5%)巩膜胶原交联能增强兔眼巩膜生物力学性能。本团队Zhang等人^[23]应用蓝光(460 nm)-核黄素(浓度0.5%)照射20 min的交联方案,发现辐照强度为22.5 mW/cm^2 时人尸眼巩膜条带生物力学性能可能最佳。

既往研究应用的交联设备只能进行局部巩膜照射,不能提供均匀的光照。2017年, Kwok等人^[24]开发了柔性光波导,采用聚二甲基硅氧烷弹性体制作波导,将蓝光通过输入光纤耦合到波导中,使眼球赤道部全周能同时得到照射,光照均匀、高效,并应用蓝光(445 nm)-核黄素(浓度0.5%)分别在辐照强度为25及50 mW/cm^2 的条件下照射30 min,证实这种柔性光波导同样能有效增强猪眼巩膜生物力学性能,波导远端与近端的交联效果无显著差异,且与直接照射法相比交联效果也无显著差异。2019年,他们又进一步改进此设备,用银反射涂层包被波导,防止光泄漏到非交联区域的眶周组织,同样能有效增强巩膜生物力学性能^[25]。然而,以上阐述的研究结果均基于动物实验阶段,为探索巩膜胶原交联术的潜在临床应用可能,还需进一步研究适应于人眼的合理化临床交联方案。

2.2 光辐照交联法防控近视的有效性

巩膜交联术增加巩膜生物力学性能的作用已得到

广泛证实, 目前国内外研究者的焦点在于将其应用于近视模型, 以进一步探究其延缓近视进展的有效性. Dotan等人^[26]首先对紫外光-核黄素巩膜胶原交联术后的兔眼建立形觉剥夺性近视模型, 证明交联能有效延缓眼轴增长. Liu等人^[27]对豚鼠眼行紫外光-核黄素巩膜胶原交联术后建立离焦诱导性近视模型, 发现交联能限制眼轴增长, 延缓屈光度向近视漂移, 在近视模型眼中交联后的巩膜胶原纤维排列比非交联眼更加规则紧密, 且巩膜组织生物力学性能增加.

Rong等人^[28]建立兔眼形觉剥夺性近视模型后, 应用离子导入法导入核黄素, 并以 10 mW/cm^2 的辐照强度照射9 min的快速交联方案, 发现交联术能延缓近视眼眼轴增长和屈光度向近视的漂移, 增强近视眼巩膜生物力学性能, 并且组织病理学检查提示, 交联对视网膜和脉络膜组织结构无明显影响. Li等人^[29]建立豚鼠离焦诱导性近视模型, 采用核黄素灌胃联合全身紫外光照射的方法, 发现交联术能延缓近视眼眼轴增长和屈光度向近视方向漂移, 使后极部巩膜厚度增加(但无统计学意义), 近视眼巩膜生物力学性能增加.

本团队的Sun等人^[30]和Li等人^[31]率先利用与人眼球结构更为相似的恒河猴为实验对象, 发现紫外光-核黄素巩膜交联与蓝光-核黄素巩膜交联两种交联法均可增强巩膜生物力学性能, 两种方案的数据均显示其巩膜力学可维持稳定性长达12个月. 紫外光-核黄素巩膜交联的安全性更优于蓝光, 这为合理选择光辐照巩膜交联方案在未来的临床转化奠定了前期研究基础. 但紫外光-核黄素巩膜交联术防控近视的长期有效性及巩膜组织生物力学的长期稳定性与否仍需深入研究, 其防控近视的干预时机问题也仍需进一步探讨, 以期为该技术合理临床转化提供更多的理论依据.

2.3 光辐照交联法的安全性

(1) 紫外光-核黄素巩膜胶原交联术的安全性. 紫外光-核黄素巩膜胶原交联术能延缓近视进展的安全性已经在动物研究水平得到证实. 本团队的Wang等人^[32]以兔为实验对象, 采用 365 nm 紫外光以 3 mW/cm^2 的辐照强度照射赤道部30 min的交联方案, 发现巩膜生物力学性能显著提高, 但在交联术后1周、1个月和3个月暗适应视网膜电图(electroretinogram, ERG)的b波波幅降低, 视网膜细胞凋亡增加(主要在外核层), 视网膜外核层厚度减少, 对于此交联方案的安全性还需

进一步探究. 而陈博宇等人^[33]的研究却发现, 采用 370 nm 紫外光以 3 mW/cm^2 的辐照强度照射30 min和以 10 mW/cm^2 的辐照强度照射9 min两种方案中, 交联眼与对照眼相比暗适应3.0和明适应3.0的振幅和潜伏期均无显著差异, 具有较好的安全性.

本团队的Sun等人^[30]和Ou-Yang等人^[32]率先以恒河猴为实验对象, 采用Wang等人^[32]相同的交联方案, 发现交联术对黄斑区视网膜厚度和浅层视网膜血流密度无影响, 但术后1周时交联区域脉络膜厚度显著减少, 然而这种改变随时间延长逐渐恢复, 在术后1个月已无明显影响, 并且术后1周、1个月和3个月交联眼的暗适应0.01ERG、暗适应3.0ERG和明适应3.0EGR的波幅无显著变化, 提示此方案对术后早期的全视网膜视神经传导功能无明显影响^[34,35]. 本团队继续将观察时间延长至术后12个月, 发现交联术对中心凹视网膜厚度、浅层视网膜血流密度和脉络膜厚度无影响, 未观察到视网膜损伤^[30]. 由此推测, 紫外光-核黄素巩膜胶原交联术具有较好的安全性, 术后早期兔眼和恒河猴眼安全性的差异可能是由于物种不同造成的. 这些研究为该技术未来临床转化提供了扎实的参考依据.

(2) 蓝光-核黄素巩膜胶原交联术的安全性. 国外相关研究显示, 当辐照强度在 $400\sim 650\text{ mW/cm}^2$ 时, 会造成成年兔眼球壁胶原结构改变与细胞变性, 如巩膜胶原纤维排列不规则且结构疏松, 巩膜各层小直径胶原纤维比例增高而大直径胶原纤维比例减少, 在内层及中层巩膜出现细胞活化而外层巩膜细胞变性, 以及色素聚集、血管塌陷、视网膜光感受器退化和巩膜内出血等变化^[36,37]. 辐照强度为 200 mW/cm^2 时, 仅在表层巩膜观察到小直径胶原纤维比例增高、细胞活化、细胞变性及巩膜出血的表现^[36]; 辐照强度低于 100 mW/cm^2 时, 巩膜的生物力学性能随辐照强度增加而增加, 而高于 100 mW/cm^2 时反而下降, 这一改变可能是由于高性能蓝光照射下胶原纤维束结构破坏导致的^[38]. 而对于幼年兔眼蓝光辐照强度阈值的研究结果提示, 低于 150 mW/cm^2 为安全阈值, 相比成年兔眼, 幼年兔眼更能抵御高性能蓝光的照射, 这可能是由于幼兔巩膜和脉络膜组织具有较高的再生潜力和辐照耐受性, 并且证实即使最小性能 15 mW/cm^2 也能有效抑制眼轴延长并维持24周^[39].

本团队的Li等人^[40]率先以恒河猴为实验对象进行蓝光-核黄素巩膜交联术的活体安全性观察, 应用

Zhang等人^[23]改良的蓝光(460 nm)-核黄素(浓度0.5%)照射巩膜赤道部20 min(辐照强度22.5 mW/cm²)的交联方案, 将恒河猴分为3组, 分别为A组(照射右眼的1个象限)、B组(照射右眼的2个象限和左眼的1个象限)和C组(照射右眼的2个象限), 以右眼为实验眼, 左眼为对照眼, 观察到术后1周, A组和C组实验眼较对照眼f-ERG振幅明显下降, 术后1月开始逐渐恢复; 术后1周, A组实验眼视网膜光感受器细胞排列紊乱、线粒体肿胀, 视网膜外核层细胞核固缩, 术后1周、1个月、3个月、6个月和12个月, 实验组和对照组的视网膜厚度、浅层视网膜血流密度和脉络膜厚度的差异无统计学意义。2021年, 本团队^[31]应用相同方案, 观察到尽管术后1年时f-ERG振幅恢复至对照眼水平, 但视网膜内核层及外核层仍可发现少量核固缩细胞。以上结果提示, 蓝光-核黄素巩膜交联的安全性值得担忧, 故限制了其未来临床转化的可能性。与蓝光-核黄素巩膜交联相比, 紫外光-核黄素巩膜胶原交联术增强巩膜生物力学性能的有效性和安全性得到了充分的证实, 有望成为一种有效防控近视的方法进一步应用于临床。

2.4 光辐照交联法对巩膜胶原代谢的影响

Rong等人^[28]将离子导入核黄素-紫外光快速巩膜交联术应用于兔眼形觉剥夺性近视模型中, 电子显微镜下可见交联近视眼巩膜成纤维细胞富含粗面内质网, 细胞膜附近可见胶原纤维, 提示胶原代谢活跃, 而未交联近视眼巩膜可见静止状态的成纤维细胞, 交联近视眼与非交联近视眼相比, 巩膜I型胶原 $\alpha 1$ 链(collagen $\alpha 1$ chain of type I, COL1A1)和I型胶原 $\alpha 2$ 链(collagen $\alpha 2$ chain of type I, COL1A2)基因表达显著增高, 巩膜胶原蛋白含量显著增高。Li等人^[29]建立豚鼠离焦诱导性近视模型, 采用核黄素灌胃联合全身紫外光照射的方法, 发现交联术后基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP2)表达减少, 基质金属蛋白酶抑制剂2(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP2)表达增加, 电子显微镜下巩膜成纤维细胞密度增加。徐海铭等人^[41]也建立豚鼠离焦诱导性近视模型, 采用核黄素灌胃联合全身紫外光照射的方法, 进一步比较传统交联、脉冲光加速交联和持续光加速交联延缓近视进展的有效性, 发现三种方法均能延缓近视进展, 增强巩膜生物力学性能, 使胶原纤维粗细更加均

匀, 使巩膜组织内MMP2表达减少、TIMP2表达增加, 但传统交联组与脉冲光加速交联组和持续光加速交联组相比, 胶原纤维排列更加稀疏, 且巩膜组织内MMP2表达增加和TIMP2表达减少更不明显。Chen等人^[42]采用3.0 mW/cm²的辐照强度照射30 min和10.0 mW/cm²的辐照强度照射9 min两种交联方案, 发现交联术后60天两种方案中巩膜成纤维细胞MMP2表达均增加, 且10.0 mW/cm²的交联方案增加更多, 推测可能由于巩膜成纤维细胞在交联术后反应性增加所致, 也可能是由于外环境变化而发生代偿反应。可见, 紫外光-核黄素巩膜胶原交联术能增加胶原合成, 影响胶原代谢, 但尚需进一步探究巩膜胶原交联术改变巩膜胶原代谢相关基因表达的分子机制。

3 生物交联剂交联法

生物交联剂交联法是一种在眼球的Tenon囊下注射生物交联剂进行巩膜交联的方法, 这些生物交联剂包括京尼平、糖类(甘油醛、核糖、蔗糖和糖原等)、甲醛释放剂(formaldehyde-releasing agents, FARs)、转谷氨酰胺酶(transglutaminases, Tgases)和甲基乙二醛等。该方法以Tenon囊下注射的方式使生物交联剂到达巩膜表面, 无需手术暴露交联部位。

3.1 京尼平

京尼平是从梔子中提取的天然交联剂, 具有良好的生物相容性与低毒性。其交联巩膜的机制可能是与氨基反应生成环烯醚萜氮化物, 随后经脱水作用形成一个芳香族单体, 再经自由基反应形成环状的分子间和分子内交联^[43]。

大量研究已表明, Tenon囊下注射京尼平能使巩膜胶原纤维排列更加致密, 并增强巩膜生物力学性能, 提高巩膜热收缩温度^[44-46], 近年来学者们进一步探索京尼平对于近视进展的影响。Wang和Corpuz^[47]形觉剥夺法诱导豚鼠近视21天, 分别于第0, 7, 14天共3次Tenon囊下注射0.1 mL浓度0.5%的京尼平, 结果显示, 该方法能有效延缓眼轴延长和屈光度向近视漂移, 巩膜胶原纤维直径增加。Levy等人^[48]将-5 D透镜离焦诱导性树鼯近视眼巩膜条带孵育于浓度为0.25 mmol/L的京尼平中24 h, 结果提示近视眼巩膜循环软化增加, 循环软化代表巩膜的非弹性特性, 其增加使巩膜更易发生非

弹性变形, 而京尼平交联后的近视眼巩膜未出现明显的循环软化, 从非弹性特性角度增加了巩膜生物力学性能. 赵亚芳等人^[49]应用形觉剥夺法诱导新西兰幼兔近视60天, 并分别于第0, 2, 4, 6天共4次Tenon囊下注射0.25 mL浓度为0.5 mmol/L的京尼平, 同样使巩膜生物力学性能增加, 有效阻止近视进展. 而Hannon等人^[50]研究发现, 挪威棕色大鼠球后注射0.15 mL浓度为15 mmol/L的京尼平1次即可有效增强巩膜生物力学性能至少4周. Wang等人^[51]将-8 D透镜离焦诱导性豚鼠近视眼巩膜条带浸泡于浓度为1%的京尼平中4 h, 结果发现近视眼巩膜微小RNA-29(miR-29)和MMP2表达增加, COL1A1表达降低, 而京尼平处理后miR-29和MMP2表达降低, COL1A1表达增加, 提示京尼平交联延缓近视进展可能与上述分子水平表达改变有关. El Hamdaoui等人^[52]研究京尼平浓度(0, 10, 20 mmol/L)和注射次数(3或5次)对树鼯形觉剥夺性近视的延缓作用, 发现随着京尼平剂量的增加, 其对玻璃体腔延长和近视增长的延缓作用增加, 这种作用呈剂量依赖性, 并发现京尼平交联后角膜厚度增加, 前房深度减少, 但造成这种影响的机制尚需进一步研究.

京尼平交联增加巩膜生物力学性能、延缓近视进展的有效性得到了验证, 研究者们又进一步探索其安全性. Wang和Corpuz^[47]于Tenon囊下注射0.1 mL浓度为0.5%的京尼平, 21天后光学显微镜下观察到注射部位周围角膜和巩膜轻度水肿, 但角膜内皮完整, 未观察到视网膜和脉络膜的组织学损伤. Hannon等人^[53]又进一步评估了球后注射15 mmol/L京尼平交联巩膜对挪威棕色大鼠视觉功能(视动反应)和视网膜功能(视网膜电图)的影响, 发现注射后4周内眼压和视网膜功能不受影响, 视觉功能未受持续影响, 4周时视网膜神经节细胞计数轻度下降, 但改变无统计学意义. 另外, 他们还初步研究了京尼平交联对巩膜和视网膜分子水平的影响, 发现注射后1周和4周时, RT-PCR检测显示巩膜细胞外基质蛋白酶和视网膜炎症因子的表达水平无显著变化, 注射后4周时, 蛋白质组学分析显示, 与蛋白结合、细胞运动和细胞外基质结构支持相关的各种巩膜蛋白质水平也无显著变化, 但样本量较小, 尚需深入研究.

3.2 糖类

还原性糖类可通过非酶糖基化反应, 即还原性糖

类的醛基与蛋白质的氨基反应, 最终生成糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs), 从而形成共价胶原交联^[54,55].

(1) 甘油醛. 甘油醛是一种单糖, 是糖代谢的中间产物, 无毒, 易渗入巩膜. 既往研究已表明, 甘油醛巩膜交联能有效增强巩膜生物力学性能, 且作用可维持至少8个月^[56], 并能增强巩膜热稳定性^[57], 无明显副作用, 仅在治疗区周围角膜观察到炎症浸润和角膜细胞丢失^[55]. Campbell等人^[58]以棕色挪威大鼠为实验对象, 发现京尼平、甘油醛和甲基乙二醛三种交联剂增强巩膜刚度的作用呈剂量依赖性, 使巩膜刚度增加100%所需的三种试剂的浓度分别为30, 1和7 mmol/L, 为将此方法应用于临床提供参考.

近年来学者们进一步探索甘油醛对于近视进展的影响. 王莹等人^[59]对形觉剥夺性豚鼠近视眼行Tenon囊下注射甘油醛, 结果显示, 该方法能有效增强巩膜生物力学性能, 控制近视进展, 且MMP-2在浅层巩膜、脉络膜实质层以及视网膜外丛状层的阳性表达明显降低. Lin等人^[60]对离焦诱导性新西兰兔近视眼行Tenon囊下注射甘油醛, 结果显示, 该方法能有效增强巩膜生物力学性能, 并抑制眼轴延长, 未见交联眼视网膜和脉络膜的组织学损伤, 且交联眼巩膜基质内可见直径大于240 nm的胶原纤维, 而在近视眼巩膜和对照组巩膜基质中均未观察到此种胶原纤维.

然而Chu等人^[61]采用与王莹等人^[59]相似的方法进行研究, 结果显示, 该方法虽然能有效增强巩膜生物力学性能, 且治疗眼视网膜和视神经未观察到异常改变, 但却无法控制近视的进展, 推测原因可能是近视早期胶原纤维并未发生显著改变, 胶原纤维的变化是随着时间推移而发生的, 甘油醛交联所带来的胶原纤维改变可能对长期进行性近视更有效.

现阶段有关甘油醛延缓近视进展有效性的研究尚未得到一致的结果, 需深入探索. 另外, Kimball等人^[62]发现, 小鼠结膜下注射甘油醛会使眼压升高, 增加视网膜神经节细胞损伤的风险, 该方法的安全性也仍需进一步探讨.

(2) 其他糖类. Kim等人^[63]对新西兰兔眼Tenon囊下注射0.15 mL的核糖、蔗糖和糖原溶液(浓度为0.1, 0.2和0.4 mol/L), 最初的14天内共注射5次, 12周时利用拉曼光谱和原子力显微镜分析交联效果, 发现三种糖类均能加强交联, 相同浓度下, 核糖较蔗糖和糖原能

产生更强的交联,且浓度越高越有效.推测可能原因是核糖作为一种还原性糖,相同剂量下主要以开链形式存在,糖基化与开链形式成正比,而蔗糖和糖原则为非还原性糖类,进行交联反应前必须被水解.另外,核糖的分子量比蔗糖和糖原小,更易穿过巩膜参与胶原交联.然而,尽管核糖能增加巩膜交联,但并无其增强巩膜生物力学性能的直接证据,故其应用于延缓近视进展的相关研究尚需深入.

3.3 甲醛释放剂

FARs是一种较新的交联剂,作为化妆品和其他个人护理产品的防腐剂使用,具有缓释的特点,能有效延长药物作用时间.

Babar等人^[64]以离体猪巩膜为实验对象,用热变性温度评价交联效果.研究表明,所选择的5个FARs,包括羟甲基甘氨酸钠(sodium hydroxymethylglycinate, SMG)、重氮咪唑烷基脲(diazolidinyl urea, DAU)、咪唑烷基脲(imidazolidinyl urea, IMU)、乙内酰脲(DMDM hydantoin, DMDM)和7-乙基二环恶唑烷(5-ethyl-3,7-dioxo-1-azabicyclo [3.3.0] octane, OCT),尤其是DAU和SMG,比 β -硝基醇交联效果更好,且细胞毒性相似甚至更小. Zyablitskaya等人^[65]以离体兔眼为实验对象,在赤道部Tenon囊下注射浓度为40和400 mmol/L的SMG 400 μ L,结果显示,注射部位及邻近组织发生交联改变,且浓度越高交联越强,SHG显微镜显示交联区巩膜存在更大的胶原束. Takaoka等人^[66]研究影响FARs释放甲醛的因素,结果显示浓度是主要因素, FARs浓度越低,甲醛释放越多. 许寅聪等人^[67]以活体兔巩膜为实验对象研究发现, SMG, DAU, IMU, DMDM和OCT均能增强巩膜生物力学性能,且具有药物浓度依赖性,其中SMG, DAU和OCT交联效果最强. Mehta等人^[68]则对SMG交联巩膜的配方进行优化,加入了羟丙基甲基纤维素(hydroxypropyl methylcellulose, HPMC),一种可以增加组织接触时间以提高药物渗透性的物质,以兔眼和猪眼巩膜为实验对象,结果表明增加HPMC浓度对SMG的交联效果未产生影响,故需要根据实际调整黏度.

虽然FARs增强巩膜生物力学性能的有效性得到了验证,但尚缺少其应用的长期安全性和交联效果稳定性的研究,以及缺乏应用于近视模型探究其延缓近视进展的相关研究.

3.4 转谷氨酰胺酶

Tgases是一种新型交联剂,一种天然酶,首次从链霉菌中分离出来,广泛应用于食品和制造业等各个领域^[69]. Tgases具有交联活性,即催化蛋白质分子内和分子间形成共价键的能力,使谷氨酰胺残基中 γ -甲酰胺基团(供体)与不同化合物的 ϵ -胺类基团(酰胺残基的受体)之间形成异肽键并诱导蛋白质之间交联^[70].

Sun等人^[71]将离体猪眼巩膜条带和完整离体猪眼孵育于浓度为1 U/mL的Tgases溶液中30 min,分别与孵育于PBS溶液中的离体猪眼巩膜条带和完整离体猪眼相比,巩膜弹性模量增加了121%和84%, Tgases交联使巩膜生物力学性能增加,胶原纤维束更加紧密,纤维间隙减少而层间隙增加.

4 巩膜胶原交联术的临床应用

目前,巩膜胶原交联术已初步应用于临床出现眼底并发症的高度近视患者的治疗. Xue等人^[72]在一项前瞻性自身对照研究中,对40名低年龄段高度近视患者(≤ 18 岁)行单眼后巩膜加固收缩术,入组标准为(i)每年近视屈光度增长不少于1.0 D, (ii)年龄 < 8 岁者,眼轴长度 ≥ 24.5 mm;年龄8~18岁者,眼轴长度 ≥ 25.5 mm.研究者将同种异体的供体巩膜条带浸泡于0.1%京尼平中5周,经规范处理后缝至术后极部,左眼为对照眼不行手术,随访2~3年,结果显示手术组术后即刻眼轴缩短,在随访期内眼轴增长0.32 mm,而对照组眼轴增长0.82 mm,术后双眼矫正视力、角膜屈光力与视网膜厚度无显著变化,无一例患者术后视力丧失,提示后巩膜加固收缩术联合京尼平交联异体巩膜条带能安全有效地降低年龄段近视患者眼轴延长至少2~3年. Zhu等人^[73]则将京尼平交联异体巩膜条带用于后巩膜加固术治疗高度近视黄斑裂孔性视网膜脱离,术后至少随访1年,结果显示该方法在使裂孔闭合、中心凹复位及抑制眼轴延长方面具有有效性.

现阶段尚无已发表的巩膜胶原交联术直接应用于活体人眼巩膜组织的研究报道,本团队通过持续多年的探索及近年来利用恒河猴眼的活体巩膜做胶原交联的深入研究,不仅证实了其作为潜在近视防控技术的可行性,也为临床合理选择光辐照巩膜交联方案提供了参考依据,现已将此项技术应用于活体人眼(研究成

表 1 巩膜胶原交联术防控近视的研究^{a)}
Table 1 Researches based on preventing from myopia by scleral collagen crosslinking^{a)}

研究者, 年份	研究对象	诱导近视方法	交联类型	交联剂注射剂量/核黄素浸泡时间	交联剂注射次数 数/光照射性能和时间	注射部位/照射部位	屈光度(D)		眼轴(mm)		弹性模量(MPa)	
							近视眼	近视交联眼	近视眼	近视交联眼	应变	近视眼 近视眼 联眼
Wang等人 ^[32] , 2015年	3周龄豚鼠	形觉剥夺性近视(21天)	0.5% 京尼平	0.1 mL	分别于第0, 7和14天注射, 共3次	鼻上和颞下象限角膜缘后3 mm Tenon囊下注射	-2.51 ±1.15	2.23 ±1.24*	11.99 ±0.65	10.73 ±0.85*	极限应变	2.17±0.75 7.23 ±2.36*
赵亚芳等人 ^[49] , 2019年	2周龄新西兰兔	形觉剥夺性近视(60天)	0.5 mmol/L 京尼平	0.25 mL	分别于第0, 2, 4和6天注射, 共4次	鼻上和颞下象限角膜缘后3 mm Tenon囊下注射	0.33±0.52	2.50 ±1.38*	15.83 ±0.41	15.33 ±0.82	未知	6.25±3.17 9.10 ±3.12*
王莹等 ^[59] , 2014年	3周龄豚鼠	形觉剥夺性近视(21天)	0.05 mol/L 甘油醛	0.5 mL	分别于第1, 5和8天注射, 共3次	颞上象限角膜缘后2 mm Tenon囊下球后注射	Δ8.800 ±0.616	Δ7.236 ±2.198*	Δ0.572 ±0.133	Δ0.527 ±0.137	6%应变	19.938 ±4.871 26.180 ±4.388#
Chu等人 ^[61] , 2016年	3周龄豚鼠	形觉剥夺性近视(28天)	0.5 mol/L 甘油醛	同上	同上	同上	Δ8.800 ±0.616	Δ6.271 ±1.112*	Δ0.572 ±0.133	Δ0.510 ±0.189	6%应变	19.938 ±4.871 30.446 ±3.410#
Lin等人 ^[60] , 2019年	7周龄新西兰兔	离焦诱导性近视(-8 D, 14天)	0.5 mol/L 甘油醛	0.15 mL	第0, 2, 4, 6, 8, 10和12天, 共7次	鼻上颞下和鼻下颞上象限交替角膜缘后3 mm Tenon囊下注射	-1.28 ±0.68	-1.47 ±1.34	7.72±0.13	7.84±0.15	6%应变	2.70±1.00 5.60 ±1.70#
Dotan等人 ^[26] , 2014年	13日龄新西兰兔	形觉剥夺性近视(55天)	紫外光-0.1% 核黄素	20 s	370 nm, 57 mW/cm ² , 200 s	各象限赤道和后极各一个点; 各象限赤道前、赤道和后极部各两个点	—	—	15.53	15.16*	10%应变	0.47±0.19 1.74 ±0.53*
Liu等人 ^[27] , 2016年	2周龄豚鼠	离焦诱导性近视(-10 D, 42天)	紫外光-0.1% 核黄素	20 s	370 nm, 57 mW/cm ² , 300 s	鼻侧和颞侧的赤道和后极部各一个点	-1.85 ±0.49	1.79 ±0.39*	9.33±0.45	8.59 ±0.28*	—	—
Rong等人 ^[28] , 2017年	10日龄新西兰兔	形觉剥夺性近视(80天), 近视后交联	紫外光-0.1% 核黄素	10 min, 离子导入	370 nm, 10 mW/cm ² , 9 min	赤道-后极部	—	—	a	b*	8%应变	c d*

a) Δ表示该指标数值与基线数值的差值, *表示近视交联眼与交联眼差异具有统计学意义(P<0.05), #表示原文中并未进行近视交联眼与交联眼的比较, ——表示原文并未进行此指标检测, abcd表示原文未附该指标的具体数据

果尚未发表), 是巩膜胶原交联技术研究成果距离完成临床转化最近的团队。

5 存在的问题及展望

随着巩膜胶原交联术防控近视研究的日益增多(表1), 其设计应用过程中仍存在一些关键性问题需进一步解决。(i) 实验对象的选择: 有研究发现人巩膜生物力学性能高于猪和兔巩膜, 在紫外光-核黄素巩膜胶原交联后兔巩膜的生物力学性能显著提高, 而人和猪巩膜无显著改变, 这可能由于不同物种巩膜结构不同而使紫外光的吸收和核黄素的渗透存在差异而造成的^[74]。而既往研究的实验对象以兔、猪和豚鼠等为主, 与人眼球结构差异较大, 因此对于交联参数设置、交联有效性、稳定性和安全性的评估等方面的研究结果也可能因物种差异而不适用于人眼, 恒河猴眼紫外光-核黄素巩膜交联的结果虽然提示长达12月的眼内安全性和巩膜生物力学的稳定性, 但是否能延缓近视的发展及维持长期持续稳定的效果尚需要深入阐明。(ii) 生物力学检测方法的选择: 既往研究在测量巩膜生物力学性能时多采用离体巩膜条带轴向拉伸实验, 此方法破坏了眼球的完整性, 无法获得真实的在体巩膜生物力学性能数据, 全眼球膨胀试验虽然没有破坏眼球的完整性, 但仍在离体状态下进行, 因此还需进一步探索能实现在体测量的仪器, 为临床力学检测及评估效果提供依据。(iii) 安全性的探究: 安全性是巩膜胶原交联术应用于临床近视防控的重要环节, 既往研究对于安全性的评估是基于恒河猴眼的, 最长随访时间为术后1年, 但更需行长期及完善的安全性探究; 同时需要探讨如何细致优化临床的巩膜交联方案以规避其潜在的并发症及副作用等问题。(iv) 巩膜交联机制的探索: 已知巩膜胶原交联术通过使胶原分子内部或分

子间建立共价结合从而提高巩膜生物力学性能, 而对于这种方法所带来的胶原代谢相关基因表达改变的具体机制尚未明了, 值得阐明从而为临床应用提供理论依据。(v) 巩膜交联的长期力学稳定性问题的探索: 目前对于巩膜交联术增强巩膜生物力学性能的恒河猴研究最长观察时间为1年, 该方法是否具有长期力学稳定性尚无证据。而目前临床实际中, 对于近视患者(包括高度近视、病理性近视等), 尤其是呈进行性发展的儿童青少年近视, 巩膜交联术能否通过一次干预即可实现长期有效延缓近视进展的效果, 是否需要多次重复干预等相关问题尚需深入研究阐明, 对未来临床应用巩膜交联技术针对进展性近视及病理性近视并发症的防控等相关工作的开展具有积极的社会价值和临床意义。

综上所述, 目前的动物研究结果提示, 光辐照交联法和生物交联剂交联法均能控制近视进展, 但这两类方法在未来的临床转化阶段, 其应用前景并非完全相同。

生物交联剂交联法以Tenon囊下注射的方式使生物交联剂到达巩膜表面, 无需手术暴露交联部位, 操作相对简单, 但交联位置无法精确设计, 具有不可控性, 可能对巩膜周围组织(眼外肌、视神经等)产生一定不良影响, 临床活体应用存在局限性, 但在后巩膜加固术中, 对于手术材料的体外应用(将供体巩膜浸泡于生物交联剂中进行交联)具有较大的临床价值。光辐照交联法中的紫外光-核黄素巩膜胶原交联术, 其有效性和安全性已在恒河猴模型上得到验证, 展现出较好的临床应用前景。尽管目前仍需通过较复杂的操作以暴露交联位置, 但此方案能使交联效果准确到达巩膜目标位置, 保证了方案可控性。随着研究的不断深化和完善, 该技术有望成为未来近视防控及病理性近视并发症防控的有效手段。

参考文献

- 1 Holden B A, Fricke T R, Wilson D A, et al. Global prevalence of myopia and high myopia and temporal trends from 2000 through 2050. *Ophthalmology*, 2016, 123: 1036-1042
- 2 Mayinuer Y, Wang N L. Vision 2020: the progress of blindness prevention and eye health in China (in Chinese). *Natl Med J China*, 2020, 100: 3831-3834 [玛依努尔·于苏甫, 王宁利. “视觉2020”: 中国防盲治盲与眼健康工作进展. *中华医学杂志*, 2020, 100: 3831-3834]
- 3 Zhang F, Lai L. Advanced research in scleral cross-linking to prevent from progressive myopia. *Asia Pac J Ophthalmol*, 2021, 10: 161-166
- 4 Krasselt K, Frommelt C, Brunner R, et al. Various cross-linking methods inhibit the collagenase I degradation of rabbit scleral tissue. *BMC*

Ophthalmol, 2020, 20: 488

- 5 Gentle A, Liu Y, Martin J E, et al. Collagen gene expression and the altered accumulation of scleral collagen during the development of high myopia. *J Biol Chem*, 2003, 278: 16587–16594
- 6 Harper A R, Summers J A. The dynamic sclera: extracellular matrix remodeling in normal ocular growth and myopia development. *Exp Eye Res*, 2015, 133: 100–111
- 7 McBrien N A, Cornell L M, Gentle A. Structural and ultrastructural changes to the sclera in a mammalian model of high myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42: 2179–2187
- 8 Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res*, 2004, 29: 35–40
- 9 Raiskup F, Spoerl E. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. I. Principles. *Ocul Surf*, 2013, 11: 65–74
- 10 Jung G B, Lee H J, Kim J H, et al. Effect of cross-linking with riboflavin and ultraviolet A on the chemical bonds and ultrastructure of human sclera. *J Biomed Opt*, 2011, 16: 125004
- 11 Choi S, Lee S C, Lee H J, et al. Structural response of human corneal and scleral tissues to collagen cross-linking treatment with riboflavin and ultraviolet A light. *Lasers Med Sci*, 2013, 28: 1289–1296
- 12 Guo P, Miao Y, Jing Y, et al. Changes in collagen structure and permeability of rat and human sclera after crosslinking. *Trans Vis Sci Tech*, 2020, 9: 45
- 13 Wollensak G, Spoerl E. Collagen crosslinking of human and porcine sclera. *J Cataract Refract Surg*, 2004, 30: 689–695
- 14 Wollensak G, Iomdina E, Dittert D D, et al. Cross-linking of scleral collagen in the rabbit using riboflavin and UVA. *Acta Ophthalmol Scand*, 2005, 83: 477–482
- 15 Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit sclera after collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet A (UVA). *Acta Ophthalmol*, 2009, 87: 193–198
- 16 Zhang X M, Zhao X, Zhang F J, et al. Investigation on the concentration of riboflavin in sclera tissue (in Chinese). *Chin J Ophthalmol*, 2015, 51: 450–454 [张学敏, 赵旭, 张丰菊, 等. 核黄素在巩膜组织内渗透性的实验研究. 中华眼科杂志, 2015, 51: 450–454]
- 17 Wang M, Zhang F, Qian X, et al. Regional biomechanical properties of human sclera after cross-linking by riboflavin/ultraviolet A. *J Refract Surg*, 2012, 28: 723–728
- 18 Gawargious B A, Le A, Lesgart M, et al. Differential regional stiffening of sclera by collagen cross-linking. *Curr Eye Res*, 2020, 45: 718–725
- 19 Zhang Y, Zou C, Liu L, et al. Effect of irradiation time on riboflavin-ultraviolet-A collagen crosslinking in rabbit sclera. *J Cataract Refract Surg*, 2013, 39: 1184–1189
- 20 Xiao B, Chu Y, Wang H, et al. Minimally invasive repetitive UVA irradiation along with riboflavin treatment increased the strength of sclera collagen cross-linking. *J Ophthalmol*, 2017, 2017: 1–6
- 21 Wang H Y, Xiao B, Chu Y H, et al. Enhancement of scleral biomechanics and safety following minimally invasive riboflavin-ultraviolet A collagen crosslinking in rabbit (in Chinese). *Chin J Ophthalmol*, 2018, 36: 96–101 [王红燕, 肖博, 楚艳华, 等. 微创核黄素-紫外线A巩膜胶原交联对巩膜生物力学强度的增强作用及安全性. 中华实验眼科杂志, 2018, 36: 96–101]
- 22 Iseli H P, Spoerl E, Wiedemann P, et al. Efficacy and safety of blue-light scleral cross-linking. *J Refract Surg*, 2008, 24
- 23 Zhang M, Zou Y, Zhang F, et al. Efficacy of blue-light cross-linking on human scleral reinforcement. *Optom Vis Sci*, 2015, 92: 873–878
- 24 Kwok S J J, Kim M, Lin H H, et al. Flexible optical waveguides for uniform periscleral cross-linking. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58: 2596–2602
- 25 Kwok S J J, Forward S, Wertheimer C M, et al. Selective equatorial sclera crosslinking in the orbit using a metal-coated polymer waveguide. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60: 2563–2570
- 26 Dotan A, Kremer I, Livnat T, et al. Scleral cross-linking using riboflavin and ultraviolet-A radiation for prevention of progressive myopia in a rabbit model. *Exp Eye Res*, 2014, 127: 190–195
- 27 Liu S, Li S, Wang B, et al. Scleral cross-linking using riboflavin UVA irradiation for the prevention of myopia progression in a guinea pig model: blocked axial extension and altered scleral microstructure. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0165792
- 28 Rong S, Wang C, Han B, et al. Iontophoresis-assisted accelerated riboflavin/ultraviolet A scleral cross-linking: a potential treatment for pathologic myopia. *Exp Eye Res*, 2017, 162: 37–47
- 29 Li X, Wu M, Zhang L, et al. Riboflavin and ultraviolet A irradiation for the prevention of progressive myopia in a guinea pig model. *Exp Eye Res*, 2017, 165: 1–6

- 30 Sun M, Zhang F, Li Y, et al. Evaluation of the safety and long-term scleral biomechanical stability of UVA cross-linking on scleral collagen in rhesus monkeys. *J Refract Surg*, 2020, 36: 696–702
- 31 Li Y, Zhang F, Sun M, et al. Safety and long-term scleral biomechanical stability of rhesus eyes after scleral cross-linking by blue light. *Curr Eye Res*, 2021, 46: 1061–1070
- 32 Wang M, Zhang F, Liu K, et al. Safety evaluation of rabbit eyes on scleral collagen cross-linking by riboflavin and ultraviolet A. *Clin Exp Ophthalmol*, 2015, 43: 156–163
- 33 Chen B Y, Han B Y, An H Q, et al. Research of safety of riboflavin-A ultraviolet cross-linking under different irradiation modes and its effects on the expression of MMP-2 in rabbit scleral fibroblasts (in Chinese). *J Med Pest Control*, 2019, 35: 355–358 [陈博宇, 韩宝雁, 安慧琴, 等. 不同照射方式下核黄素-A波紫外线交联作用的安全性及对兔巩膜成纤维细胞MMP-2表达影响的研究. *医学动物防制*, 2019, 35: 355–358]
- 34 Ou-Yang B W, Sun M S, Wang M M, et al. Early changes of ocular biological parameters in rhesus monkeys after scleral cross-linking with riboflavin/ultraviolet-A. *J Refract Surg*, 2019, 35: 333–339
- 35 Sun M, Zhang F, Ouyang B, et al. Study of retina and choroid biological parameters of rhesus monkeys eyes on scleral collagen cross-linking by riboflavin and ultraviolet A. *PLoS ONE*, 2018, 13: e0192718
- 36 Karl A, Makarov F N, Koch C, et al. The ultrastructure of rabbit sclera after scleral crosslinking with riboflavin and blue light of different intensities. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2016, 254: 1567–1577
- 37 Iseli H P, Körber N, Karl A, et al. Damage threshold in adult rabbit eyes after scleral cross-linking by riboflavin/blue light application. *Exp Eye Res*, 2015, 139: 37–47
- 38 Schuldt C, Karl A, Körber N, et al. Dose-dependent collagen cross-linking of rabbit scleral tissue by blue light and riboflavin treatment probed by dynamic shear rheology. *Acta Ophthalmol*, 2015, 93: e328–e336
- 39 Iseli H P, Körber N, Koch C, et al. Scleral cross-linking by riboflavin and blue light application in young rabbits: damage threshold and eye growth inhibition. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2016, 254: 109–122
- 40 Li Y, Liu C, Sun M, et al. Ocular safety evaluation of blue light scleral cross-linking *in vivo* in rhesus macaques. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2019, 257: 1435–1442
- 41 Xu H M, Liu H, Yu J, et al. Pulsed and continuous accelerated scleral cross-linking using riboflavin and ultraviolet A irradiation for the prevention of myopia progression in a guinea pig model (in Chinese). *Chin J Exp Ophthalmol*, 2018, 36: 767–772 [徐海铭, 刘辉, 余洁, 等. 核黄素-紫外线A照射加速巩膜交联治疗豚鼠实验性近视. *中华实验眼科杂志*, 2018, 36: 767–772]
- 42 Chen B, Li X, Sun Y, et al. Study of the effects of rabbit scleral fibroblasts on cellular biomechanical properties and MMP-2 expression using two modes of riboflavin/ultraviolet A wave collagen cross-linking. *Exp Eye Res*, 2021, 212: 108695
- 43 Sung H W, Huang R N, Huang L L H, et al. *In vitro* evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1999, 10: 63–78
- 44 Liu T X, Wang Z. Collagen crosslinking of porcine sclera using genipin. *Acta Ophthalmol*, 2013, 91: e253–e257
- 45 Liu T X, Wang Z. Biomechanics of sclera crosslinked using genipin in rabbit. *Int J Ophthalmol*, 2017, 10: 355–360
- 46 Wu Y, Ci R, Tang Y, et al. Effect of Genipin Collagen Crosslinking on Porcine Sclera (in Chinese). *Chin J Strab Pediatr Ophthalmol*, 2019, 27: 24–26 [吴元, 次仁琼达, 汤韵, 等. 天然生物交联剂京尼平对猪巩膜交联效果的初步研究. *中国斜视与小儿眼科杂志*, 2019, 27: 24–26]
- 47 Wang M, Corpuz C C C. Effects of scleral cross-linking using genipin on the process of form-deprivation myopia in the guinea pig: a randomized controlled experimental study. *BMC Ophthalmol*, 2015, 15: 89
- 48 Levy A M, Fazio M A, Grytz R. Experimental myopia increases and scleral crosslinking using genipin inhibits cyclic softening in the tree shrew sclera. *Ophthalmic Physiol Opt*, 2018, 38: 246–256
- 49 Zhao Y F, Xu Y C, Wang C Y, et al. Inhibitory effect of scleral crosslinking using genipin on form-deprivation myopia in rabbits (in Chinese). *Chin J Exp Ophthalmol*, 2019, 37: 962–963 [赵亚芳, 许寅聪, 王超英, 等. 京尼平巩膜交联对兔形觉剥夺性近视形成的抑制作用. *中华实验眼科杂志*, 2019, 37: 962–963]
- 50 Hannon B G, Schwaner S A, Boazak E M, et al. Sustained scleral stiffening in rats after a single genipin treatment. *J R Soc Interface*, 2019, 16: 20190427
- 51 Wang M, Yang Z K, Liu H, et al. Genipin inhibits the scleral expression of miR-29 and MMP2 and promotes COL1A1 expression in myopic eyes of guinea pigs. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2020, 258: 1031–1038
- 52 El Hamdaoui M, Levy A M, Gaonkar M, et al. Effect of scleral crosslinking using multiple doses of genipin on experimental progressive myopia

- in tree shrews. *Trans Vis Sci Tech*, 2021, 10: 1
- 53 Hannon B G, Luna C, Feola A J, et al. Assessment of visual and retinal function following *in vivo* genipin-induced scleral crosslinking. *Trans Vis Sci Tech*, 2020, 9: 8
 - 54 Sady C, Khosrof S, Nagaraj R. Advanced maillard reaction and crosslinking of corneal collagen in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 214: 793–797
 - 55 Wollensak G, Iomdina E. Crosslinking of scleral collagen in the rabbit using glycerinaldehyde. *J Cataract Refract Surg*, 2008, 34: 651–656
 - 56 Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties after collagen crosslinking of sclera using glycerinaldehyde. *Acta Ophthalmol*, 2008, 86: 887–893
 - 57 Wollensak G. Thermomechanical stability of sclera after glycerinaldehyde crosslinking. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2011, 249: 399–406
 - 58 Campbell I C, Hannon B G, Read A T, et al. Quantification of the efficacy of collagen cross-linking agents to induce stiffening of rat sclera. *J R Soc Interface*, 2017, 14: 20170014
 - 59 Wang Y, Han Q H, Han F M, et al. Experimental study of glycerinaldehyde cross-linking of posterior scleral on FDM in guinea pigs (in Chinese). *Chin J Ophthalmol*, 2014, 50: 51–59 [王莹, 韩泉洪, 韩风梅, 等. 甘油醛后巩膜交联治疗豚鼠形觉剥夺性近视眼的研究. 中华眼科杂志, 2014, 50: 51–59]
 - 60 Lin X, Naidu R K, Dai J, et al. Scleral cross-linking using glycerinaldehyde for the prevention of axial elongation in the rabbit: blocked axial elongation and altered scleral microstructure. *Curr Eye Res*, 2019, 44: 162–171
 - 61 Chu Y, Cheng Z, Liu J, et al. The effects of scleral collagen cross-linking using glycerinaldehyde on the progression of form-deprived myopia in guinea pigs. *J Ophthalmol*, 2016, 2016: 1–8
 - 62 Kimball E C, Nguyen C, Steinhart M R, et al. Experimental scleral cross-linking increases glaucoma damage in a mouse model. *Exp Eye Res*, 2014, 128: 129–140
 - 63 Kim T G, Kim W, Choi S, et al. Effects of scleral collagen crosslinking with different carbohydrate on chemical bond and ultrastructure of rabbit sclera: future treatment for myopia progression. *PLoS ONE*, 2019, 14: e0216425
 - 64 Babar N, Kim M J, Cao K, et al. Cosmetic preservatives as therapeutic corneal and scleral tissue cross-linking agents. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56: 1274–1282
 - 65 Zyablitskaya M, Takaoka A, Munteanu E L, et al. Evaluation of therapeutic tissue crosslinking (TXL) for myopia using second harmonic generation signal microscopy in rabbit sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58: 21–29
 - 66 Takaoka A, Cao K, Oste E M, et al. Topical therapeutic corneal and scleral tissue cross-linking solutions: *in vitro* formaldehyde release studies using cosmetic preservatives. *Biosci Rep*, 2019, 39: BSR20182392
 - 67 Xu Y C, Tong C M, Zhao Y F, et al. Study on the efficacy of formaldehyde sustained-release preservatives in scleral cross-linking of living rabbits (in Chinese). *Int Eye Sci*, 2019, 19: 1288–1292 [许寅聪, 仝春梅, 赵亚芳, 等. 甲醛缓释体类防腐剂对活体兔巩膜交联有效性的研究. 国际眼科杂志, 2019, 19: 1288–1292]
 - 68 Mehta J, Takaoka A, Zyablitskaya M, et al. Development of a topical tissue cross-linking solution using sodium hydroxymethylglycinate (SMG): viscosity effect. *Biosci Rep*, 2020, 40: BSR20191941
 - 69 Wang X, Xiong Y L, Sato H. Rheological enhancement of pork myofibrillar protein-lipid emulsion composite gels via glucose oxidase oxidation/transglutaminase cross-linking pathway. *J Agric Food Chem*, 2017, 65: 8451–8458
 - 70 Kieliszek M, Misiewicz A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiol*, 2014, 59: 241–250
 - 71 Sun X, Chen D, Liu X, et al. Effect of enzyme-induced collagen crosslinking on porcine sclera. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 528: 134–139
 - 72 Xue A, Zheng L, Tan G, et al. Genipin-crosslinked donor sclera for posterior scleral contraction/reinforcement to fight progressive myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59: 3564–3573
 - 73 Zhu S Q, Pan A P, Zheng L Y, et al. Posterior scleral reinforcement using genipin-cross-linked sclera for macular hole retinal detachment in highly myopic eyes. *Br J Ophthalmol*, 2018, 102: 1701–1704
 - 74 Zhang Y, Li Z, Liu L, et al. Comparison of riboflavin/ultraviolet-A cross-linking in porcine, rabbit, and human sclera. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 1–5

Advances in preventing myopia by scleral collagen crosslinking

XU YuShan, SONG YanZheng & ZHANG FengJu

Beijing Keynote Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China

The prevention of myopia is crucial due to its increasing prevalence globally. Myopia development is associated with scleral remodeling and reduced scleral biomechanical properties. Scleral collagen crosslinking is a new, effective approach to prevent myopia clinically, including photo-crosslinking by light irradiation (ultraviolet A and riboflavin scleral collagen crosslinking, and blue light and riboflavin scleral collagen crosslinking) and crosslinking by biological crosslinkers (genipin, carbohydrate, FARs, and Tgases). This article summarizes the relevant research on the application scheme, validity, and safety of scleral collagen crosslinking to prevent myopia.

sclera, collagen crosslinking, myopia

doi: [10.1360/SSV-2021-0078](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0078)